

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-180801

(43)Date of publication of application : 23.07.1993

(51)Int.Cl.

G01N 27/447  
B01D 57/02  
G01N 30/48  
// CO7K 3/14

(21)Application number : 03-279962

(71)Applicant : UNIV INDIANA FOUND

(22)Date of filing : 25.10.1991

(72)Inventor : NOVOTNY MILOŠ V  
DOLNIK VLADISLAV  
COBB KELLY A

(30)Priority

Priority number : 90 603589 Priority date : 26.10.1990 Priority country : US

### (54) SUPPRESSION OF ELECTROOSMOSIS BY FILM STABLE AGAINST HYDROLYSIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To suppress electroosmosis flow in chromatography, especially, an electrophoretic system.

CONSTITUTION: A method for coating the inner wall of a capillary tube, for example, used in chromatography, especially, electrophoretic separation with an org. polymer layer in order to lower the surface charge of the inner wall of the capillary tube is provided. At first, the silanol group of the surface of the inner wall of a capillary tube is converted to a silicon halide group which is, in turn, reacted with an organometal reagent having a terminal ethenyl component to be converted to Si-R (R continuously holds a terminal ethenyl group) and, finally, this surface is treated by bonding this ethenyl group to a neutral org. monomer in addition polymerization reaction in order to form a monomolecular non-crosslinked polymer layer on the surface. The obtained polymer layer is bonded to silica through an Si-C bond and stable under a wide range pH condition.

(19)日本国特許庁 ( J P )

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-180801

(43)公開日 平成5年(1993)7月23日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup> G 0 1 N 27/447 B 0 1 D 57/02 G 0 1 N 30/48	識別記号 庁内整理番号  L 8506-2J 7235-2J 7235-2J	F I	技術表示箇所
		G 0 1 N 27/26 3 3 1 Z 3 1 5 Z	
審査請求 有 請求項の数10(全 12 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平3-279962	(71)出願人	591239058 インディアナ ユニバーシティ ファウン デーション アメリカ合衆国, インディアナ 47402, ブルーミントン, ハイウェイ 46 パー パス
(22)出願日	平成3年(1991)10月25日	(72)発明者	ミロス ブイ, ノボトニ アメリカ合衆国, インディアナ 47408, ブルーミントン, ノース ペントン ドラ イブ 4600
(31)優先権主張番号	6 0 3 5 8 9	(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外3名)
(32)優先日	1990年10月26日		
(33)優先権主張国	米国 ( U S )		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 加水分解に安定な被膜による電気浸透の抑制

## (57)【要約】

【目的】 本発明はクロマトグラフィー、特に電気泳動のシステムにおける電気浸透フローを抑制せしめることを目的とする。

【構成】 本発明は、クロマトグラフィー、特に電気泳動分離において用いられる例えばシリカキャピラリーの内壁の表面電荷を低めるために有機ポリマー層により被覆せしめる方法を提供する。この層は、まず表面のシラノール基をハロゲン化シリコン基に変換せしめ、次いでこの基を末端エテニル成分を有する有機金属試薬と反応させて、ハロゲン化シリコン基を Si-R へと変換せしめ (R は末端エテニル成分を保持し続ける)、最後にこの表面上に単一分子の架橋されていないポリマー層を形成せしめるために付加重合反応においてこのエテニル基を中性有機モノマーと結合せしめることで処理される。得られるポリマー層は Si-C 結合を介してシリカと結合し、広範囲の pH 条件に安定である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 暴露されているシラノール基の静電荷を低めるために該シラノール基を有する固体の表面を処理する方法であって以下のもの：

(a) 該暴露されているシラノール基をハロゲン化シリコン基へと変換せしめるために該表面を処理し；

(b) 該表面を末端エチレン成分を含む脂肪族基Rを含む有機金属化合物と反応させて、該末端エチレン結合を保持しながら該ハロゲン化シリコン基をS—R基へと変換せしめ；そして

(c) 該表面に共有結合するポリマー層を形成せしめるために該末端エチレン基に付加重合が可能な中性有機物質と該S—R基を反応せしめること；を含んで成る方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記の段階(c)の中性有機質が、アクリレート、アクリルアミド、置換されたアクリルアミド、並びにアルキル、アリール、及びハロゲン—置換されているエチレンより成る群から選ばれるモノマー物質である方法。

【請求項3】 請求項1に記載の方法であって、前記の段階(c)の中性有機質がアクリルアミドである方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法であって、前記の有機金属化合物がR—L<sub>1</sub>及びR—Mg—X（ここでXはハロゲンであり、そしてRはエチニルである）より成る群から選ばれる構成員である方法。

【請求項5】 請求項1に記載の方法であって、前記の有機金属化合物がR—Mg—X（ここでRはエチニルであり、そしてXは塩素及び臭素より成る群から選ばれる構成員である）の式で表わされるものである方法。

【請求項6】 請求項1に記載の方法であって、前記の段階(a)のハロゲン化シリコン基の前記のハロゲンが塩素及び臭素より成る群から選ばれる構成員である方法。

【請求項7】 請求項1に記載の方法であって、前記の段階(a)が、前記の暴露されているシラノール基を塩化シリコン基へと変換せしめるために前記の表面を塩化チオニルにより処理せしめることを含んで成る方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、前記の固体表面が融合シリカの表面である方法。

【請求項9】 内側の表面が請求項1に記載の方法により有機ポリマーで被覆されているシリカ含有材料のキャピラリー。

【請求項10】 液体サンプルにおけるタンパク質混合物を組成分へと分離せしめる方法であって、該サンプルをシリカ含有材料のキャピラリー中に、該キャピラリーにおいて該タンパク質の電気泳動分離を促進せしめる条件下で通過せしめることを含んで成る方法（該キャピラリーの内壁はポリアクリルアミドの層により被覆され、該ポリアクリルアミドは該シリコン含有材料と、該キャピラリーのS—R原子を該ポリアクリルアミドのC原子と

2

直接連結する結合により共有結合している）。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は電気泳動において用いられる容器、チャンバー及びその他の構造物に焦点を合わせた被覆シリカ材料の分野に属する。

【0002】

【従来の技術】 固体構成要素は電気泳動及びクロマトグラフィー系において種々の機能を提供する。ある系においては固体構成要素は溶質を区画せしめるものとして、その他においてはそれらは分離媒体の置かれる支持壁として働く。それ故固体構成要素は、利用される分離機構並びに分離媒体の配列、大きさ及び形に依存して粒子、チューブ及びプレートとして用いられる。固体構成要素を利用する分離システムの中には、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子量排除クロマトグラフィー、並びにスラブルゲル電気泳動、チューブゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動（ゲル状及び溶液のタイプの両方）、等速電気泳動及び等電点電気泳動を含む種々の型の電気泳動が挙げられる。ある場合において、この固体構成要素は分離において能動的な役割を果たし、その他の場合において受動的な役割を果たす。

【0003】 これらの多数のシステム、特に固体構成要素がシリカ含有材料であるシステムにおいて発生する現象は固体構成要素と、壁に隣接する液体又はゲル分離媒体との間に存在する界面動電位から発生する電気浸透、又はの名を電気浸透フローである。この電位により生ずる流れは、固体表面に対して接線方向に電場を付与する際に生ずるバルクフロー（bulk flow）である。多数の系において、このバルクフローは分離工程を妨害するものとして考えられている。

【0004】 電気浸透フローはあらゆるこれらの形態において生ずることがあり、特にキャピラリーにおいてその壁表面積は内容量に対して割合が高いため、そして壁と分離すべきサンプル成分との密接性のため問題が存在する。キャピラリーは非常に少量のサンプルの分析を、オンライン分光検出及び高電圧を利用することによって分離を高いスピードで達成せしめることが特に著しい。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従ってクロマトグラフィー、そして特に電気泳動システムにおいて電気浸透フローを抑制することが本発明により向けられる目的である。

【0006】 本発明の向けられる更なる課題はこのような技術によるタンパク質の分離において起こる現象である。タンパク質はシリカの表面に吸着する固有の性質を有する。ほとんどの分離工程においてこの吸着は望ましくなく、なぜならこれはピークのブロード化及び非対称形を導き、そしてそれ故分解能を悪くし、分析の精度及

3

び再現性を低める。

【0007】タンパク質吸着は電気浸透フローに対して感受性なシステムにおける特有の概念であり、なぜなら吸着タンパク質はゼータ (zeta) 電位を含む幾何特性に影響を及ぼすからである。膜上の吸着タンパク質の量又は分散の変化は単独工程及び連続工程の両方において、その流れの電気浸透の貢献を変化せしめ、信頼性のある、且つ有意な比較及び検出を行なう困難さを更に悪化せしめるであろう。更に、これらの概念は特にキャピラリー系において重要であり、それはキャピラリーの形態及びキャピラリー壁の大きな作用に起因する。

【0008】シリカ表面によりタンパク質の吸着を低める、又はなくす種々の方法が論文において報告されている。一般にこれらの方法は以下の2つの手法のうちの1つを包含する。即ち、

(1) 適切な緩衝液pH及びイオン強度を選択することによりタンパク質とシリカの間のクーロン反発 (Coulombic repulsion) を作ること；及び

(2) 吸着部位として機能する表面電荷を低めるために中性物質をシリカ表面に化学結合させることである。

【0009】第1の手法の例は、融合シリカの負電荷を低めるために低pHのリン酸緩衝液を用い、そしてリン酸基をシリカ表面上に保護スクリーニングの型として分散せしめることを記載する。McCormick, R.M., Anal. Chem. 60 : 2322-2328 (1988)により報告されている。イオン性改質剤の加えられたこの高いpHの緩衝液の利用はLa uer, H.H. らの, Anal. Chem. 58 : 166-170 (1986) 及び Walbroehl, Y. らのJ. Microcolumn Sep. 1 : 41-45 (1989)により報告されている。これらの著者により報告されている通り、これらの緩衝液はタンパク質を、負に荷電されたキャピラリー壁により反発される負に荷電された物質へと変換せしめる。

【0010】第2の手法はグリコール含有物質を融合シリカに結合せしめたJorgenson, J.W. らのScience 222 : 266-272 (1983)により採用されている。Eijertsen, S. J. のJ. Chromatogr. 347 : 191-198 (1985)には、メチルセルロース及びオルガノシリコン結晶を介して結合した架橋されていないポリアクリルアミドの利用を報告している。オルガノシリコン表面誘導により適用されたポリ (ビニルピロリジノン) 被膜の利用は前記のMcCormickより報告され、そしてポリエチレングリコール被膜の利用は Bruin, G.J.M. らのJ. Chromatogr. 471 : 429-436 (1989)により報告されている。

【0011】これらの手法のそれぞれは一定の利点を有するが、同様にそれらは特にそれらの適用性の範囲の限定にもとづく欠点を有する。緩衝液のpH及びイオン強度の追償を包含する手法は分離が起こるであろうもとのpHの範囲において限定され、それ故タンパク質は分離される。シリカ表面の被膜を包含する手法は長期間の安定性、特にアルカリ条件のもとでの安定性の問題を有す

4

る。シロキサン (Si-O-Si-C) 結合を介しての結合の広く利用される技術は、例えば塩基性条件のもとでの求核分解を受ける傾向を有する。

【0012】タンパク質の選別のためには、タンパク質の種々の相異、及びタンパク質分子上の電荷に基づくpHの強力な影響、そしてそれ故それらの移動度の性質のため、広範囲の緩衝液及びpH値から選択することが重要である。ある混合物は低いpHで最も良く分離され (タンパク質の等電点より低い値)、一方他の混合物はタンパク質の等電点より高いpH値でより良く分離される。それ故理想的な系は、高及び低pH支配の両方において安定であり、且つ利用できるものであろう。

【0013】

【課題を解決するための手段】広範囲の条件及び長期間にわたり有効且つ安定であり続けるシリカ含有物質表面上の静電荷を抑制又は削除する新規の方法がこの度開発された。本方法に従うと、ポリマー被膜はシリカ表面にわたり適用され、この被膜は従来の中間シロキサン成分を伴わずにSi-C結合を介してこの表面と結合している。本方法は、シラノール基によりもたらめられている部位に利用し易いエチル結合を配置し、その後のポリマー層の形成及び共有結合のために適当な物質によるエチル結合を介する付加反応を包含する。本明細書において用いる語「エチル結合」は以下を意味する。

【化1】



利用し易いエチル結合の取付けは末端エチル成分を有する有機金属試薬の利用により達成される。

【0014】ポリマーをシリカ表面に固定することの結合は、広範囲のpH (強酸から強塩基) にわたり安定であり、且つ長期間安定であり続ける。得られる被膜はシリカ表面の電気浸透フロー及び吸着部位の両方を低めるか又は削除し、シリカに広範囲な多様な利用、いい換えるなら異なるタイプのタンパク質へのそのらの適用並びに高度をピーク分離能及び効率性を提供する。

【0015】更なる本発明の特徴、目的及び利点は以下の説明から明白となるであろう。

【0016】本発明に従うと、シリカ含有物質の表面上のシラノール基をまずグリニヤール試薬とのそれらの反応の準備のためにハロゲン化シリコン基に変換せしめる。これは当業者が既知の常用の方法により達成される。一般のハロゲン原子が利用される。塩素及び臭素が好ましく、特に塩素が好ましい。

【0017】塩素化の好ましい方法は塩化チオニルの利用を介する。この反応は一般に高められた温度、好ましくは50℃以上の温度で液相において、不活性雰囲気において行われる。溶媒を利用することがあるが、この反応は溶媒を利用しなくても行うことができる。

5

【0018】次にこのハロゲン化表面部位を、末端エテニル成分を有する脂肪族基を含む有機金属により処理せしめる。好ましい有機金属はオルガノリチウム、オルガノマグネシウム及びオルガノナトリウム化合物である。オルガノリチウム及びオルガノマグネシウムが特に好ましく、それらの一般式はそれぞれ $R-Li$ 及び $R-Mg-X$ である。これらの式において $R$ は末端エテニル成分を含む脂肪族基であり、そして $X$ はハロゲンである。好ましい $R$ 基は5個又はそれ未満の炭素原子数の直鎖基であり、アリル及びビニル基が特に好ましく、そしてビニル基が最も好ましい。有機金属の式における $X$ 原子は一般にハロゲンを表す。塩素、臭素及びヨウ素が好ましいハロゲンであり、塩素及び臭素が好ましく、そして臭素が最も好ましい。好ましい有機金属試薬の例にはビニルリチウム、アリルリチウム、ビニルマグネシウムプロマイド、ビニルマグネシウムクロライド、アリルマグネシウムプロマイド及びアリルマグネシウムクロライドが挙げられる。

【0019】有機金属化合物による反応は一般に不活性な乾燥雰囲気のもとで行われる傾向にある。この有機金属試薬は極性溶媒、一般にはエーテル、例えばジエチルエーテル又はテトラヒドロフランにおける液体溶液において一般に利用され、そしてこの反応は高い温度、好ましくは約50℃又はそれより高い温度で一般に行われる。

【0020】有機金属試薬による反応は $R$ 基の末端エテニル基を保持しながらハロゲン化シリコン基を $S-1-R$ 基に変換せしめる。次にこのシリカの表面にわたり単一分子ポリマー層を形成せしめるためにエテニル基に付加重合可能な物質とこの表面を反応させ、そしてそれらにシラール基により最初に占められていた部位にて共有結合させる。本工程のこの段階において用いるこの物質は広範囲にわたり変えることができる。例としてアクリレート、アクリルアミド、置換されたアクリルアミド、並びにアルキル、アリル及びハロゲン置換されたエチレンが挙げられる。この中で好ましいのはアクリレート、アクリルアミド及び置換されたアクリルアミドであり、アクリルアミドが最も好ましい。アクリルアミドの場合において、架橋されていないポリアクリルアミドの単一分子層が得られる。

【0021】付加反応は当業者が既知の反応条件及び付加試薬を利用する常用の技術に従って行われる。この反応は一般に重合触媒の存在下であり、ポリアクリルアミドの場合は塩基性触媒である。主な例には、アミン塩基、例えば $N, N', N''$ -トリメチルエチレンジアミン（「TEMED」又は「TMEDA」）、 $\beta$ -ジメチルアミノプロピオニトリル及びトリエタノールアミンが挙げられる。この触媒の他に重合開始剤が一般に用いられる。重合開始剤の一般例にはフリーラジカル開始剤、例えばパーオキシド、パースルフエート又はアゾ

6

化合物が挙げられる。例としてベンゾイルパーオキシド、テルト-ブチルパーオキシド、テルト-ブチルヒドロパーオキシド、テルト-ブチルパーベンゾエート、キュミル（cumyl）パーオキシド、アセチルパーオキシド、ラウロイルパーオキシド、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、フェニルアゾトリフェニルメタン並びにパースルフエート、例えばカリウムパースルフエート及びアンモニウムパースルフエートが挙げられる。最適な触媒及び開始剤の各ケースにおける選択は反応すべき物質、そしておそらく反応条件に依存するであろう。これらの反応が起こる条件は一般に当業者に知られ、そしてそれらは本方法において同様に適用できる。

【0022】本発明は一般のシリカ含有表面に適用できる。例として融合シリカ、ガラス及びクォーツが挙げられる。本発明は更に、スラブ、チューブ、ビーズを含む広範囲にわたる形態並びにその他の外形、形及びサイズスケールに適用できる。前述の通り本発明はキャピラリーに適用することを特に目的とし、そのキャピラリーはその内壁に被覆が適用されている。このキャピラリーの大きさは分離工程の要望自体に依存する選択に従って変えることができるであろう。ほとんどの場合においてこのキャピラリーは約5ミクロン〜約250ミクロン、好ましくは約20ミクロン〜約100ミクロンに範囲する内径を有するであろう。同様にこのキャピラリーの長さはいくつの場合においても約5cm〜約500cm、好ましくは約10cm〜約100cmに範囲するであろう。

【0023】この処理表面を利用して行われる分離工程は同様に広範囲にわたり変えることができる。本発明に従って処理せしめたキャピラリーは一般に、ゲル及び液相の両方の電気泳動を含み、そして特にタンパク質混合物の分離において有用な電気泳動工程に有用である。

【0024】以下の実施例は実例を示す目的で提供し、本発明の範囲を限定するものではない。

【0025】

【実施例】

例1

キャピラリー処理工程

試薬、溶媒及びキャピラリー：タンパク質及び緩衝液組成成分、並びに $N, N', N''$ -トリメチルエチレンジアミン（TEMED）及び電気泳動用アクリルアミドはSigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.)から購入した。残りの試薬及び溶媒の購入先は以下の通りである：試薬級アンモニウムパースルフエートはMallinkrodt Inc. (Paris, Kentucky, U.S.A.)より購入；ビニルマグネシウムプロマイド（テトラヒドロフラン中に1.0M）はAldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.)より購入；塩化チオニル（9.9%）はEM Science (Cherry Hill, New Jersey, U.S.A.)より購入し、使用前に蒸留せしめた；そしてテトラヒドロフラン（THF）はJ.T.Baker, Inc. (Phillipsburg, New

7

Jersey, U.S.A.)より購入し、そしてモレキュラーシーパーにより乾燥せしめた。

【0026】緩衝液の調製において蒸留水を用い、そして全ての緩衝液は、0.2 μmのナイロン66メンブランフィルター(Alltech Associates, Deerfield, Illinois, U.S.A.)で濾過せしめた。サンプル溶液は約0.2 mg/mLの濃度で水にタンパク質を溶解せしめることで調製した。

【0027】融合シリカキャピラリー (内径50 μm, 長さにおいて約1 m)をまず1MのNaOHで約30分間すすぎ、次に蒸留水で30分間すすいだ。このキャピラリーを窒素パージにより110°Cで一夜乾燥せしめた。

【0028】A. 表面の塩素化  
2 mLのバイアルの塩化チオニルを小さなチャンパー (加圧室) に入れ、その後窒素を15分間吹き込み全ての酸素を除去せしめた。このキャピラリーの一端をこのチャンパーに挿入し、そして窒素をこのキャピラリーに数分間に通した。この挿入されたキャピラリーの端を次に塩化チオニルの中流下げ、そして窒素の一定の流れを密閉され、且つ加圧状態に保たれたこのチャンパーに通し、これによって塩化チオニルをこのキャピラリーに引き込んだ。このキャピラリーが塩化チオニルで充填したら、小さなプロバンテーチを利用してこのキャピラリーをチャンパー付近近にシールした。このキャピラリーの反対の端を次にすばやくバキューム装置に取付け、そしてこのキャピラリーを真空中に引き、そして60ミリトル又はそれ未満の真空度で約20分間保ち、その間このキャピラリーを浴槽に浸して60°Cに保った。真空ラインの接続点付近のキャピラリーの端を次にプロバンテーチでシールし、そしてこの密閉キャピラリーを70°Cの浴槽に12時間置いた。

【0029】B. グリニヤール試薬との処理  
窒素パージのもとの、そしてゴム隔壁(septum)の覆った10 mLのバイアルに5 mLの乾燥THFを入れた。窒素をこのバイアル中のTHFに数分間吹き込んだ。ピニルマグネシウムブロマイド(1 mL)を次にドライシリンジによってこのTHFに加え、そしてこの溶液を窒素でパージせしめた。

【0030】本例のAからの、シールされた塩素化キャピラリーを乾燥THFに浸しながらその一端をピンセツトで折った。これによって作られた解放端をすばやくピニルマグネシウムブロマイド/THF溶液に入れた。このキャピラリーの他端を次に折り、そして直ちに真空ラインに接続した。ピニルマグネシウムブロマイド/THFを真空によりこのキャピラリーの中に取り込んだ。この溶液をキャピラリー中に数分間通し、その後この溶液中のキャピラリーの端をバイアル隔壁の近くでプロバンテーチによりシールせしめた。次にこのキャピラリーを50°Cに加熱した浴槽に移し、そして真空(60ミリ

8

トル又はそれ未満)に30分間保った。キャピラリーの他端を真空ライン接続点付近でシールし、そしてこの密閉されたキャピラリーを70°Cの浴槽に12時間放置した。

【0031】C. ポリアクリルアミド被膜の形成  
本例のBからの密閉キャピラリーの端を折り、そしてこれによって解放となったキャピラリーをTHFで数分間すすいだ。次にこのTHFを除去し、そしてこのキャピラリーを蒸留水で数分間すすぎ、その後この水を除去した。

【0032】10%のアクリルアミド0.3 mL, 水0.7 mL, TEMED 1 μL及び10%アンモニウムバースルフェート10 μLを混合してアクリルアミド溶液を調製し、そしてこの混合物を脱気した。このキャピラリーを次にこの溶液で満たした。30分間後、過剰量のアクリルアミドをこのキャピラリーから水を用いてすすぎ出し、このキャピラリーの内壁上にアクリルアミドの化学結合層(重合化、しかし架橋していない)が残った。

【0033】D. 処理の再現性  
5本のキャピラリーを前記の方法においてポリアクリルアミドにより被覆した。次にそれぞれを以下の条件のもとでα-ラクトアルブミン(α-lactalbumin)により試験した:

【0034】緩衝液: 0.05 Mのグルタミン、トリエチルアミン(pH9.5);  
キャピラリー: 50 μm i.d. (内径) × 60 cm (検出器迄45 cm);  
インジェクション: 流体力学的; 落差20 cmにより5秒間;

適用電圧: 20 kV, 15 μA, 負の極性 (陰極はインジェクション端側)

【0035】各試験について測定された理論段数は次の式、

【数1】

$$N = \frac{(1 \text{ 次モーメント})^2}{2 \text{ 次モーメント}}$$

を利用して求められる(Nが理論段数)。次に相対標準偏差を移動時間及び理論段数の両方について求め、両方共被覆キャピラリーについては5%未満であった。被覆されていないキャピラリーについては相対標準偏差は共に3%未満であった。

【0036】例2及び例3は例1の方法に従って製造したキャピラリーの利用及び被覆されていないキャピラリーとのこれらのキャピラリーの比較を示す。例2及び例3において用いられる装置及び方法は以下の通りである。

【0037】Spellman High Voltage Electronic Corporation (Plainville, New Jersey, U.S.A.)から購入の高電圧電力供給器(0~30 kV)を用いた。検出は、波長変更可能なUV-吸光度検出器(UVDEC-100-V, Jasco,

Tokyo, Japan)を用い、2.14 nmで測定した。用いたキャピラリーは内径50  $\mu\text{m}$ 、そして外径187  $\mu\text{m}$ の融合シリカキャピラリー(Polywico Technologies, Phoenix Arizona, U.S.A.)であった。光窓(optical window)はポリアクリルアミド被膜の小さな領域を除去することで、それぞれのキャピラリーにおいて作った。サンプルは容量において約1.2 nLであり、これは約240 pgのそれぞれのタンパク質に相当する。サンプルは流体力学的フローにより導入し、そしてサンプル容量はRose, D. J.らのJ. Chromatogr. 438 : 23-24 (1988)に記載の通り、に既知のインジェクション時間及び測定される流体力学フローの速度を用いて計算される。

【0038】被覆されていないキャピラリーを0.1 MのNaOH及び緩衝液により逐次約2分間、各試験の間

\*  
表 1

図1についてのサンプル混合物

タンパク質	分子量	等電点
1. インスリン鎖A (ブタ)	2,500	4.3
2. 血清アルブミン (ウシ)	66,000	4.7
3. オバアルブミン (ニワトリの卵)	45,000	4.7
4. インスリン (ブタ)	6,000	5.4
5. $\alpha$ -ラクトアルブミン (牛乳)	14,200	4.8
6. $\beta$ -カゼイン (牛乳)	24,000	4.5
7. インスリン鎖B (ブタ)	3,500	7.6

【0041】分離のための条件は以下の通りである。

緩衝液: 0.05 Mのグルタミン、トリエチルアミン (pH9.5);

キャピラリー: 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  60 cm (検出器迄45 cm);

インジェクション: 流体力学的; 落差20 cmにより5秒間;

適用電場: 被覆キャピラリー: 20 kV、15  $\mu\text{A}$ 、負の極性 (陰極はインジェクション端側);

被覆されていないキャピラリー: 10 kV、7  $\mu\text{A}$ 、正の極性 (陽極はインジェクション端側)

【0042】被覆キャピラリーによる試験のために用いた適用電位は被覆されていないキャピラリーによる試験のそれより明らかに高いことに注目したい。被覆キャピラリーの使用においては電気浸透フローがなかったため、このより高い電圧はタンパク質のキャピラリーを通過して陰極へ向う速い移動を促進するために働いた。被覆されていないキャピラリーにおいて、強い電気浸透フローが陰極の方向において発生し、そしてそれはサンプル

\*一回のみすすいだ。電気浸透フローについての試験は中性マーカーとしてのアセトン (2%の水溶液) の利用により行った。このような試験は1日当たり少なくとも2回行うか、キャピラリー被覆における種々の緩衝液系効果を追う際に必要と考えるだけ行なった。データ収集及び処理はIBMのパーソナルコンピュータにより行なった。

【0039】例2

高pHでのタンパク質分離

A. 分解能における壁の処理の効果

以下のタンパク質の混合物において、分離をpH9.5で行い、被覆されていないキャピラリー及び本発明に従って被覆せしめたキャピラリーを用いた。

【0040】

【表1】

1

イオンにおける主な移動力であり、反対の方向における電気浸透フローの力はイオンを分けるために働き、そしてこのようにして制限されたピーク分解能が得られることを導く。この結果は各ケースにおいて最も長い分離であった。

【0043】この結果を図1に示し、図1の(a)において被覆キャピラリーを利用して得られる典型的な検出器のトレースを、そして図1の(b)において被覆していないキャピラリーを利用して得られるものを示す (条件は前述の通り)。各ピークにより示されるタンパク質の記号は前述の表1に記載と一致する番号で表した。2つのトレースの比較から、被覆キャピラリーは明らかに改良された分離を提供することが明らかである。

【0044】B. 移動時間の再現性における壁の処理の効果

被覆された、及び被覆されていないキャピラリーの両方について5回の試験を利用して、各タンパク質の移動時間の相対標準偏差を求めた。この結果を以下の表2に記す。

【0045】

\* \* [表2]

表 2

## 移動時間標準偏差

タンパク質	%相対標準偏差 ( $n=5$ )	
	被覆された キャピラリー	被覆されていない キャピラリー
インスリン鎖 A (ブタ)	0.11	3.51
血清アルブミン (ウシ)	0.18	2.69
オバアルブミン (ニワトリ卵)	0.19	3.03
インスリン (ブタ)	0.12	2.23
$\alpha$ -ラクトアルブミン (牛乳)	0.32	2.56
$\beta$ -カゼイン (牛乳)	0.25	1.93
インスリン鎖 B (ブタ)	0.20	1.64

【0046】表2のデータが示す通り、本発明に従ったキャピラリーの被覆は電気浸透フロー及び分析物の吸着の移動時間における影響を受ける再現性において大きな改善をもたらした。

【0047】被覆キャピラリーにおいて電気浸透フローがないことを確認するため、中性マーカーとしてのアセトンを利用した電気浸透フロー試験を前記の例1に記載の通りに行った。20 kVの正の極性にて電力供給器によりアルカリ条件に3時間暴露させた後に行った試験において、この中性マーカーは検出器に現れなかった。m<sup>2</sup>/V-秒における電気浸透フロー係数は以下のJorgenson, J.W. らのJ.Chromatogr. 53: 1298-1302 (1981) による式により求められる。

【0048】

【数2】

$$\mu_{eo} = \frac{L_{tot} \cdot L_{sep}}{V \cdot t_o}$$

ここで $\mu_{eo}$ =電気浸透フロー係数 $L_{tot}$ =キャピラリーの全長 $L_{sep}$ =インジェクション端から検出器迄のキャピラリーの長さ $V$ =適用電圧 $t_o$ =中性マーカーの移動時間

この式の適用により、被覆キャピラリーにおける3時間以降の電気浸透フローは $1.25 \times 10^{-3} \text{ m}^2 / \text{V-秒}$ より小さく、被覆されていないキャピラリーにおいて生ずるものは $5.4 \times 10^{-4} \text{ m}^2 / \text{V-秒}$ であった。

【0049】C. 分離効率及びピークの形における壁の処理の効果

被覆された及び被覆されていないキャピラリーの両方についての理論段数及びピークスキュー（ピークの非対称性）を $\alpha$ -ラクトアルブミン及び血清アルブミンを用いて測定した。これらのパラメータの計算は以下の通り、Kirkland, J.J. らのJ.Chromatogr. Sci. 15: 303-316 (1977) により開示の方法に従って行った（N=理論段数）。

【数3】

$$N = \frac{(1 \text{ 次モーメント})^2}{2 \text{ 次モーメント}}$$

【数4】

$$\text{ピークスキュー} = \frac{3 \text{ 次モーメント}}{(2 \text{ 次モーメント})^{3/2}}$$

この結果を表3に記載した。

【0050】

【表3】



表 3

pH9.5で分離したタンパク質についての理論段数及びピークスキュー

タンパク質	電圧 (kV)	電流 ( $\mu$ A)	1メーター当りの理論段数		ピークスキュー (a)	
			被覆	非被覆	被覆	非被覆
$\alpha$ -ラクトアルブミン	10	7	283,000	71,000	0.049	0.939
	15	11	251,000	59,000	0.061	0.996
	20	15	216,000	42,000	0.077	1.075
	25	21	194,000	35,000	0.079	1.101
ウシアルブミン	10	7	259,000	69,000	0.059	1.018
	15	11	233,000	56,000	0.078	1.024
	20	15	209,000	48,000	0.081	1.108
	25	21	107,000	42,000	0.087	1.117

(a) 0から0.002に範囲するピークスキュー値は完全な正限分布ピークを示験する。  
1.0以上のピークスキュー値は中程度から大きなテーリングを示験する。

【0051】表3のデータは理論段数及びピークスキューの両方より、被覆キャピラリーは被覆されていないキャピラリーよりも優れた状態において働くことが示された。特にピークスキューについての値は被覆キャピラリーにおいて非常に小さなテーリングを示唆した。このことより、発生するあらゆるタンパク質吸着は可逆性であり、且つ平衡化は迅速な速さで生ずることを示す。  
【0052】図2のデータを作製することにおいて用いた緩衝液は前述のグルタミン／トリエチルアミン緩衝液である。効率性における緩衝液組成の考えられる効果の研究のため、平行試験においてグルタミン／トリエチルアミン緩衝液の代りにホウ酸緩衝液（0.05Mのホウ酸ナトリウム、pH9.5）を用いた。ホウ酸緩衝液による分解能はやや不満足なものであったにもかかわらず

ず、このホウ酸緩衝液はグルタミン／トリエチルアミン緩衝液と非常に近い、又は幾分改善されたN及びピークスキュー値を提供した。N及びピークスキューの類似性は、緩衝液成分とタンパク質の相互作用がピークのブロード化の原因でないことを示す。また、これはトリエチルアミンが被覆キャピラリーに残ったシラノール基をマスクするために働かないことを示唆し、そしてキャピラリーの表面電荷における低下はポリマー被膜が実際にもたらすことを示す。

【0053】D. 長期安定性  
pH9.5の緩衝液により4週間連続して（夜間は緩衝液を水で置換）、150回多いインジェクションを含む利用の後の電気浸透フロー試験が示すには、電気浸透フローは測定可能な範囲へと戻ることはなく、そしてタ

ンバク質の移動時間は5日間にわたり2%未満の相対標準偏差で毎日一定であり続けた。これにより被膜物質は完全に保持され、そしてこのキャピラリーの壁はこの期間にわたり中性であり続けたことを示す。

【0054】更に、このキャピラリー壁をpH 1.0、5で5日間暴露せしめてもキャピラリー被膜の劣化の証拠は認められなかった。しかしながらこの被膜の劣化はキャピラリーにおいてpH 1.1の緩衝液を2日保留せしめることで引き起こされ、この保留時間後の電気浸透フロー試験は $6.8 \times 10^{-4} \text{ m}^3 / \text{V} \cdot \text{秒}$ の電気浸透フロー係数を示した。この値は被覆されていないキャピラリーについて測定される値よりも比較的小さいため、ポリアクリルアミド被膜が部分的に除去されてキャピラリー表面上の自由なシラノール基を暴露せしめたことを示唆する。

\*

表

## \*【0055】例3

低pHでのタンパク質分離

A. 分解能における処理の効果

低いpHでの分離は、非常に塩基性のタンパク質、例えば等電点が1.0、0より高いものを扱う際に特に有効である。陰イオンとしてのこのようなタンパク質の分離はpHが1.1~1.2の範囲におけるpHの緩衝液を必要とするであろう。これはキャピラリーの安定性又は同様にサンプルの成分の安定性のために実用的でない。しかしながら低いpHではタンパク質は正電荷を受け入れ、そして陰極に向って移動する。

【0056】塩基性タンパク質を低いpHで分離させるため、以下のタンパク質混合物を用いた。

【0057】

【表4】

4

図2についてのサンプル混合物

タンパク質	分子量	等電点
11. チトクロームC (ウマ心臓)	12,400	10.7
12. リゾチーム (ニワトリ卵白)	14,100	11.1
13. トリプシン (ウシすい臓)	24,000	10.1
14. トリプシノーゲン (ウシすい臓)	23,700	8.7
15. トリプシンインヒビター (ダイズ)	20,100	4.5

【0058】分離のための条件は以下の通りである。

緩衝液: 0.03Mのクエン酸 (pH 2.7; 1MのNaOHにより調整)

キャピラリー:  $50 \mu\text{m}$  i.d.  $\times 60 \text{ cm}$  (検出器迄45 cm);

インジェクション: 流体力学的; 20 cmの落差により5秒間;

適用電場: 被覆キャピラリー: 20 kV, 10  $\mu\text{A}$ ;

被覆されていないキャピラリー: 12 kV, 5  $\mu\text{A}$ ; 両ケースにおいて陽極

【0059】高いpHでの実験と同様、被覆キャピラリーのために用いた高い電圧は分離を促進せしめた。

【0060】図2において示す結果は、図2の(a)において被覆キャピラリーを用いて得られる典型的な検出器トレースを示し、そして図2の(b)において被覆されていないキャピラリーを利用して得られるもの(前述の条件のもと)で、それぞれのピークにより示されるタンパク質の記号は、前記の表4と一致する番号により示した。

【0061】2つのトレースの比較から、被覆キャピラリーは明らかに改善された分離を、高いpHと同様に低いpH条件のもとでも提供することが明らかとなった。更

に、被覆キャピラリーにおいて検出可能な電気浸透フローは認められなかった。

【0062】前述の式に従って計算した被覆されていないキャピラリーにおける電気浸透フロー係数は $2.4 \times 10^{-4} \text{ m}^3 / \text{V} \cdot \text{秒}$ であり、これは前述の例2のpH 9.5での被覆されていないキャピラリーにおいて発生するものよりもおよそ2倍速かった。このように低められた電気浸透フロー及び長期化した分離時間にもかかわらず、被覆されていないキャピラリーにおける分解能は被覆キャピラリーにおいて得られるものよりも未だ劣っていた。更に、被覆キャピラリーにより得られる改善されたピークの形は、タンパク質と被覆キャピラリー壁との静電的相互作用が小さくなったことを示唆する。

【0063】B. 移動時間の再現性における壁の処理の効果

被覆された及び被覆されていないキャピラリーの両者についてそれぞれ5回の試験を行い、それぞれのタンパク質の移動時間の相対標準偏差を計算した。結果を以下の表5に記載した。

【0064】

【表5】

表 5

移動時間標準偏差

タンパク質	% 相対標準偏差 (n = 5)	
	被覆された キャピラリー	被覆されていない キャピラリー
チトクローム C (ウマ心臓)	0.21	1.84
リゾチーム (ニワトリ卵白)	0.24	2.13
トリプシン (ウシすい臓)	0.28	2.36
トリプシノーゲン (ウシすい臓)	0.31	2.84
トリプシンインヒビター (ダイズ)	0.25	3.12

【0065】ここでも表におけるデータは、本発明に従うキャピラリーの被覆が大きく再現性における改善をもたらすことを示した。

【0066】C. 分離の効率性及びピークの形における壁の処理の効果

被覆された及び被覆されていないキャピラリーの両方に\*

\*についての理論段数及びピークスキューをチトクローム C 及びトリプシノーゲンを用いて計算した。

【0067】この結果を表6に記す。

【0068】

【表6】

表 6

pH9.5で分離したタンパク質についての理論段数及びピークスキュー

タンパク質	電圧 (kV)	電流 ( $\mu$ A)	1メーター当りの理論段数		ピークスキュー	
			被 覆	非 被 覆	被 覆	非被覆
チトクローム C	10	4	317,000	76,000	0.041	1.006
	15	6	298,000	62,000	0.057	1.027
	20	9	235,000	54,000	0.071	1.116
	25	12	194,000	51,000	0.077	1.127
トリプシノーゲン	10	4	297,000	73,000	0.035	0.904
	15	6	276,000	63,000	0.049	0.930
	20	9	220,000	59,000	0.063	1.018
	25	12	187,000	55,000	0.079	1.079

【0069】ここでも表6におけるデータは、被覆キャピラリーにおいて見られる理論段数は被覆されていないキャピラリーのそれよりもかなり大きく、そしてピークスキューについての値は被覆キャピラリーにおいては若干のテーリングのみを示唆し、それに比べ被覆されていないキャピラリーにおいては有意なテーリングが示唆された。

【0070】D. 長期安定性

被覆キャピラリーをpH2.7で2週間使用し、毎日の電気浸透フロー試験により検出可能なものとしての劣化の徴候は認められなかった。次にこのキャピラリーをpH2.0で1週間使用し、測定可能な電気浸透フローは認められなかった。最も優れた分離はpH2.7で得られた。

【0071】以上は実例を示すことを目的として記載し

た。当業者により本発明の範囲を逸脱することなく容易に変更、置換及び改良を行うことができることが明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】高いpHのもとで、本発明に従って被覆せしめたキャピラリー (a)、及び被覆していないキャピラリー (b) において行った電気泳動分離の検出器のトレースである。

【図2】低いpHのもとで、本発明に従って被覆せしめたキャピラリー (a)、及び被覆していないキャピラリー (b) において行った電気泳動分離の検出器のトレースである。

【符号の説明】

1…インスリン類A (ブタ) のピーク

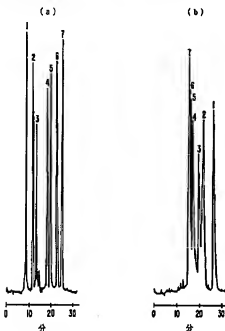
2…血清アルブミン (ウシ) のピーク

19

- 3…オバアルブミン（ニワトリ卵）のピーク  
 4…インスリン（ブタ）のピーク  
 5… $\alpha$ -ラクトアルブミン（牛乳）のピーク  
 6… $\beta$ -カゼイン（牛乳）のピーク  
 7…インスリン銀B（ブタ）のピーク

【図1】

高いpHのもとで、本発明に従って被覆せしめたキャピラリー  
 (a)、及び被覆していないキャピラリー(b)において行った  
 電気泳動分離の検出時のトレース

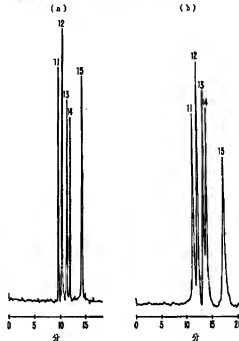


20

- 11…チトロクロームC（ウマ心臓）のピーク  
 12…リゾチーム（ニワトリ卵白）のピーク  
 13…トリプシン（ウシすい臓）のピーク  
 14…トリプシノーゲン（ウシすい臓）のピーク  
 15…トリプシンインヒビター（ダイズ）のピーク

【図2】

高いpHのもとで、本発明に従って被覆せしめたキャピラリー  
 (a)、及び被覆していないキャピラリー(b)において行った  
 電気泳動分離の検出時のトレース



## 【手続補正書】

【提出日】平成3年11月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、前記の段階(c)の中性物質が、アクリレート、アクリルアミド、置換されたアクリルアミド、並びにアルキル、アリール、及びハロゲン-置換されているエチレンより成る群から選ばれるモノマー物質である方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】有機金属試薬による反応はR基の末端エチル基を保持しながらハロゲン化シリコン基をS1-R基に変換せしめる。次にこのシリカの表面にわたり単一分子ポリマー層を形成せしめるためにエチル基に付加重合可能な物質とこの表面を反応させ、そしてそれらにシラノール基により最初に占められていた部位にて共有結合させる。本工程のこの段階において用いるこの物質は広範囲にわたり変えることができる。例としてアクリレート、アクリルアミド、置換されたアクリルアミド、並びにアルキル、アリール及びハロゲン-置換されたエチレンが挙げられる。この中で好ましいのはアクリレート、アクリルアミド及び置換されたアクリルアミドであり、アクリルアミドが最も好ましい。アクリルアミドの場合において、架橋されていないポリアクリルアミドの単一分子層が得られる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>4</sup>

// C 0 7 K 3/14

識別記号

庁内整理番号

7731-4H

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ブラジスラブ ドルニク  
チェコスロバキア国、ブルノ、ツァブコバ  
6 602 00

(72)発明者 ケリー エー. コブ  
アメリカ合衆国、インディアナ 47408,  
ブルミントン、ノース スミス ロード  
800, アパートメント 40-ワイ